

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: **Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Molekulární biologie a biochemie organismů**



**Eliška Miková**

**Role neutrofilů u preeklampsie**  
The role of neutrophils in preeclampsia

Typ závěrečné práce:

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce/Školitel:

**RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.**

Praha, 2019

**Poděkování**

Ráda bych poděkovala celému kolektivu laboratoře imunologie na Ústavu imunologie a mikrobiologie za to, že mě přijali do svých řad a za všechnu pomoc a podporu při práci v laboratoři. Dále moc děkuji svému školiteli Jiřímu Hrdému za trpělivost a cenné rady.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 01.05.2019

Podpis

## Abstrakt

Preeklampsie je v současné době jednou z hlavních příčin maternální těhotenské morbidity a mortality. Na rozvoji onemocnění se podílí velké množství faktorů, ale hlavní zdroj zůstává neznámý. Placenty žen s preeklampií jsou definované zvýšenou zánětlivou odpovědí. Prvními buňkami migrujícími do místa zánětu jsou neutrofily. Současné studie poukazují na značnou heterogenitu neutrofilů, dříve považovaných za terminálně diferencovanou populaci s velmi omezenou plasticitou. Dysbalance mezi proporčními a funkčními vlastnostmi prozánětlivých a imunoregulačních subpopulací neutrofilů, včetně myeloidních supresorových buněk, může vést k těžkým komplikacím v průběhu těhotenství, jako je například preeklampsie. Lepší pochopení příčin vzniku abnormálních subpopulací neutrofilů a jejich role při patogenezi preeklampsie by mohlo pomoci odhalit možné terapeutické cíle.

**Klíčová slova:** subpopulace neutrofilů, preeklampsie, NETóza, myeloidní supresorové buňky, myeloperoxidáza, elastáza, PD-L1, zánět

## Abstract

Preeclampsia is currently one of the leading causes of maternal morbidity and mortality. Disease development is caused by multiple factors but the main trigger remains unknown. Preeclamptic placentas are defined by increased inflammatory environment. One of the first cells to enter the site of inflammation are neutrophils. Current studies uncover considerable heterogeneity of neutrophils which used to be considered as terminally differentiated population with a very limited plasticity. Disbalance in the proportional and functional properties of proinflammatory and immunosuppressive neutrophil subpopulations including myeloid derived suppressor cells can lead to severe pregnancy complications such as preeclampsia. Better understanding of the origin of abnormal neutrophil subpopulations and their role in the pathogenesis of preeclampsia could help reveal possible targets for therapeutic intervention.

**Key words:** neutrophil subpopulations, preeclampsia, NETosis, myeloid derived suppressor cells, myeloperoxidase, elastase, PD-L1, inflammation

## Seznam zkratek

ACPA	anti-citrullinated protein antibody (anticitrulinové protilátky)
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibody (antineutrofilní cytoplazmatické protilátky)
Arg-1	argináza 1
CB	cord blood (pupečnicková krev)
CBMC	cord blood mononuclear cells (mononukleární buňky pupečnickové krve)
CD	cluster of differentiation (diferenciační antigen)
cfDNA	cell-free DNA (volná cirkulující DNA)
CXCR	chemokinový receptor
ELAM-1	endothelial-leukocyte adhesion molecule 1
eoPE	early-onset preeclampsia (časná preeklampsie)
E-selectin	endothelial selectin (endoteliální selektin)
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (formyl-methionylleucylalanin)
fMLP-R	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin receptor
FMR	feto-maternální rozhraní
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor (faktor stimulující kolonie granulocytů)
G-CSFR	granulocyte-colony stimulating factor receptor
HELLP	Hemolysis-Enhanced Liver enzymes-Low Platelets
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (mezibuněčná adhezivní molekula)
IDO	indolamin-2,3-dioxygenáza
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
IL	interleukin
loPE	late-onset preeclampsia (pozdní preeklampsie)
LPS	lipopolysacharid
MAP	mean arterial pressure (střední arteriální tlak)
MDSC	myeloid-derived suppressor cells (myeloidní supresorové buňky)
MMP	matrixová metaloproteináza
MPO	myeloperoxidáza
NE	neutrofilní elastáza
NETs	neutrophil extracellular traps (neutrofilní extracelulární pasti)

NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (nukleární faktor kappa B)
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin (lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů)
NO	nitric oxide (oxid dusnatý)
PAD4	peptidylarginin deimináza 4
PB	peripheral blood (periferní krev)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleární buňky periferní krve)
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PE	preeklampsie
PIGF	placental growth factor (placentální růstový faktor)
PMN	polymorphonuclear neutrophil (polymorfonukleární neutrofil)
PPE	placenty pacientek s preeklampií
ROS	reactive oxygen species (volné kyslíkové radikály)
RUPP	reduced uterine perfusion pressure
SDF1	stromal cell-derived factor 1 (stromální buněčně derivovaný faktor 1)
SEM	scanning electron microscope (skenovací elektronový mikroskop)
sEng	soluble endoglin (rozpustný endoglin)
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase 1 (solubilní fms-like tyrosin kináza)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (signální transduktor a aktivátor transkripce 3)
STBM	syncytiotrophoblast microparticles (syncytiotrofoblast derivované mikročástice)
TEM	transmission electron microscope (transmisní elektronový mikroskop)
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$ (transformující růstový faktor $\beta$ )
TLR	toll-like receptor (receptor skupiny toll)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$ (faktor nekrotizující nádory $\alpha$ )
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (cévní adhezivní molekula)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)
VEGFR1	vascular endothelial growth factor receptor 1
VLA-4	very late antigen-4 (pozdní aktivační antigen 4)

## Obsah

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREEKLAMPSIE .....</b>	<b>2</b>
2.1. Incidence a faktory zvyšující riziko preeklampsie .....	2
2.2. Patogeneze.....	3
2.3. Symptomy a klinické příznaky .....	5
2.4. Klasifikace .....	6
2.5. Komplikace.....	7
<b>3. NEUTROFILY.....</b>	<b>8</b>
3.1. Vývoj .....	8
3.2. Role v zánětlivé odpovědi .....	10
3.3. Funkce.....	11
3.4. Subpopulace neutrofilů .....	13
<b>4. ROLE NEUTROFILŮ U PREEKLAMPSIE .....</b>	<b>15</b>
4.1. Migrace neutrofilů do placenty .....	15
4.2. Aktivace neutrofilů .....	15
4.3. Produkce ROS a oxidativní stres .....	16
4.4. Asociace neutrofilů s angiogenními a antiangiogenními faktory.....	17
4.5. NETs v patogenezi preeklampsie .....	17
4.6. Vliv neutrofilů na rozvoj hypertenze .....	18
4.7. Modulace imunitní odpovědi neutrofily .....	19
4.8. Subpopulace neutrofilů a jejich role v rozvoji preeklampsie.....	19
<b>5. DISKUZE A ZÁVĚR.....</b>	<b>20</b>
<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>21</b>

## 1. Úvod

Pro zdárný průběh těhotenství je důležité nastavení správných imunoregulačních odpovědí, kdy imunitní systém matky toleruje alogenní plod. Nadměrná indukce prozánětlivých subpopulací neutrofilů vede k těhotenským patologiím, jako je například preeklampsie (PE). Přesto, že byly popsány jisté rizikové faktory vzniku PE, příčina rozvoje této choroby nebyla dosud zcela objasněna. Jediným způsobem léčby tedy zůstává porod a s ním spojené odloučení placenty, která je zdrojem patologických faktorů uvolňovaných do maternální cirkulace.

Neutrofilý jsou prvními buňkami pronikajícími do zánětlivé tkáně, kde pomáhají eliminovat zdroj infekce a nastolit homeostázu. Neutrofilý jsou velice efektivními buňkami se schopností fagocytózy, přičemž pozřené patogeny následně eliminují pomocí produktů oxidačního vzplanutí a antimikrobiálních peptidů, které jsou přítomny v granulách neutrofilů. Neutrofilý jsou schopné obsah svých granul uvolňovat i do mezibuněčného prostoru v procesu zvaném degranulace. Obsah granul se dostává do extracelulárního prostoru i při NETóze, jejímž principem je uvolnění DNA asociované s antimikrobiálními proteiny a peptidy za účelem tvorby komplexní extracelulární sítě zvané neutrofilní extracelulární past (NET), sloužící k zachycení a usmrcení bakterií a dalších patogenních mikroorganismů. Zvýšená akumulace NETs byla pozorována i v placentách pacientek s preeklampií (PPE), což by mohlo výrazně přispívat k rozvoji patologické zánětlivé reakce. V poslední době se ukazuje, že neutrofilý jsou velice heterogenní buněčnou populací a v imunitní odpovědi hrají rozsáhlejší roli, než se předpokládalo. Současný výzkum se zaměřuje na subpopulace neutrofilů s imunosupresivním fenotypem, které mají významnou úlohu v regulaci zánětlivé reakce a indukcí tolerogenního prostředí. Centrem zájmu mnoha studií se staly myeloidní supresorové buňky (myeloid derived suppressor cells, MDSC), subpopulace neutrofilů derivovaná z myeloidní linie, jejichž zvýšená hladina představuje jednu z výrazných charakteristik normálního těhotenství a snížení expanze této subpopulace bylo spojeno s těhotenskými komplikacemi, jako například PE.

Provázanost neutrofilů a PE je známá již dlouho. Omezené možnosti výzkumu ale neumožnily důkladný a dostatečný vhled do mechanismu funkce neutrofilů v průběhu této těhotenské komplikace. S rozvojem nových vědeckých technologií se ale objevují podrobnější informace a pozornost se k vlivu neutrofilů na rozvoj PE vrací. Další výzkum neutrofilů a jejich funkcí v zánětlivém prostředí PPE by mohl odhalit nové potenciální terapeutické možnosti, vedoucí ke zlepšení prognózy žen trpících tímto závažným onemocněním. Cílem bakalářské práce bude shrnutí dosavadních informací o roli neutrofilů v rozvoji a patogenezi PE, se zaměřením na jednotlivé subpopulace a jejich funkční vlastnosti v patologicky zánětlivém prostředí PPE.

## 2. Preeklampsie

Závažná těhotenská komplikace preeklampsie představuje jednu z hlavních příčin maternální morbidity a mortality hlavně v rozvojových zemích. Charakterizována je nově diagnostikovaným výskytem vysokého tlaku ( $\geq 140/90$  mm Hg) a přítomností bílkovin v moči ( $\geq 0,3$  g/24 h) po 20. týdnu těhotenství. Podle doby výskytu a závažnosti symptomů ji klasifikujeme jako časnou ( $\leq 34$  týdnem těhotenství) a pozdní ( $\geq 37$  týdnem těhotenství).

PE definujeme jako multiorgánové onemocnění. Jako původce patologického zánětu ale byla identifikována placenta. Plodové lůžko produkuje velké množství angiogenních a antiangiogenních faktorů, jejichž dysbalance hraje zásadní roli v patogenezi tohoto onemocnění. Neléčená PE může vést k nebezpečným až fatálním komplikacím jak pro matku tak pro plod. Nebezpečí také vyvstává, když dojde k přechodu těžké PE v eklampsii. Tato komplikace se projevuje tonicko-klonickými křečemi a je život ohrožující. Zřídka se mohou příznaky objevit i po narození dítěte, označované jako *postpartum* preeklampsie.

Doposud nebylo přesně definováno, co a jak preeklampsii vyvolává. Absence těchto poznatků neumožnila vývin léčebných postupů, které by komplikacím zabránily, a proto zatím zůstává nejúčinnějším způsobem léčby vyvolání porodu. Známý jsou pouze určité predispozice a faktory (primiparita, obezita, hypertenze) zvyšující riziko rozvinutí PE, ale ani ty nemají stoprocentní prediktivní hodnotu.

### 2.1. Incidence a faktory zvyšující riziko preeklampsie

Míra incidence PE se velice rozrůžňuje v závislosti na tom, kde byla data pro studie sbírána. Nejčastěji je ale uváděno, že tato těžká porucha těhotenství postihuje 3-8 % těhotných žen (Wallis *et al.*, 2008; Hernández-Díaz *et al.* 2009; Rodriguez-Lopez *et al.*, 2017). Výskyt PE se také liší v závislosti na roční době, teplotě (Janani *et al.*, 2017), klimatu a environmentálních faktorech (Magnus *et al.*, 2001).

Klinickými faktory zvyšujícími riziko patogeneze jsou obezita (Jääskeläinen *et al.*, 2018), primiparita, historie PE u žen s vícečetným těhotenstvím nebo rodinná anamnéza (Yancey *et al.*, 2011). Tyto faktory jsou také predispozicí k rozvoji těhotenské hypertenze, která může v PE vyústit. K přesné predikci PE bohužel nejsou jednotlivé rizikové faktory dostačující, ale určitou nadějí nabízí sledování jejich kombinace (Rodriguez-Lopez *et al.*, 2017). Jako nejspolehlivější se ukázala být dvojice faktorů MAP (střední arteriální tlak, mean arterial pressure)  $\geq 80$  mm Hg s chronickou hypertenzí a nadváha/obezita, která zvyšuje riziko PE u prvorodiček 9,4 krát a u mnohočetných těhotenství až 172 krát (Cordero-Franco *et al.*, 2018).



## 2.2. Patogeneze

PE je definována, podle typických projevů a symptomů, jako dvoufázové onemocnění.

První fáze, nazývána preklinická nebo placentální, probíhá v 8. - 18. týdnu těhotenství. Neschopnost trofoblastu ustanovit na počátku těhotenství správnou uteroplacentální cirkulaci má za následek nedostatečné krevní zásobení placenty a oxidativní stres. Ischemická placenta následně produkuje do mateřské cirkulace angiogenní a antiangiogenní faktory, přispívající k druhé fázi onemocnění. K rozvoji této fáze jasně a výrazně přispívá imunitní systém a deregulace zánětlivé odpovědi.

Fáze dvě, jinak také klinická nebo maternální, probíhá po 20. týdnu těhotenství a je definována symptomy a klinickou manifestací u matky, vyvstávajícími ze systematického vaskulárního zánětu.

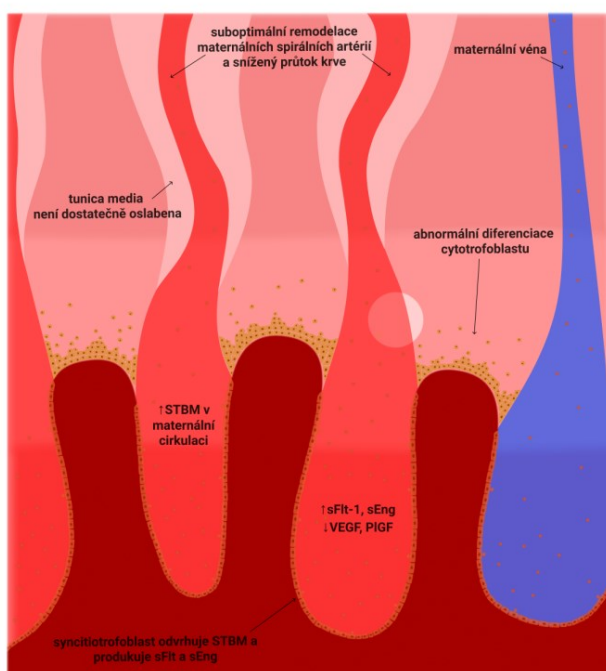
### 2.2.1. Placentální fáze

Jak bylo ukázáno u žen s hypertenzí (Brosens, 1964), stěžejním krokem ve správném vývoji placenty je remodelace mateřských spirálních arterií indukovaná placentálním trofoblastem invadujícím dělohu. Dochází k oslabení *tunica media* a částečnému nahrazení endotelu maternálních cév cytotrofoblastem (viz Obrázek 1). Tyto změny napomáhají zvýšenému toku krve, který zajišťuje dostatečné krevní zásobení vyvíjejícího se plodu.

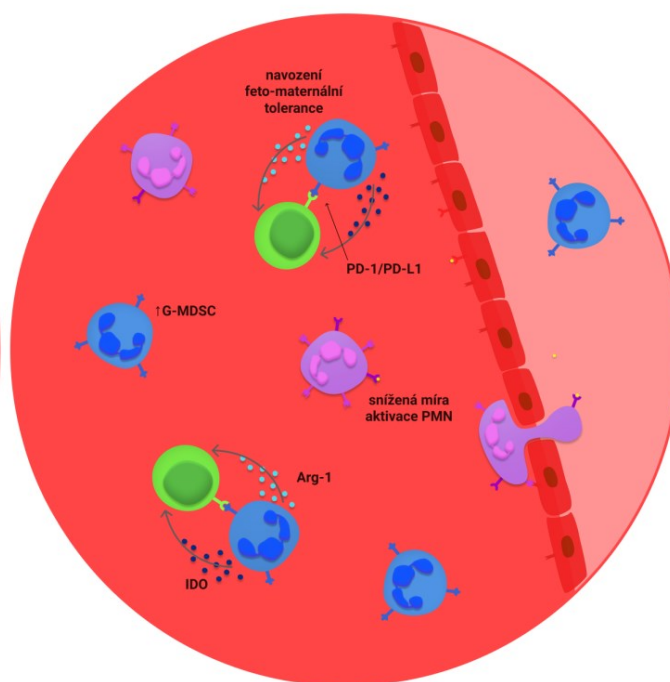
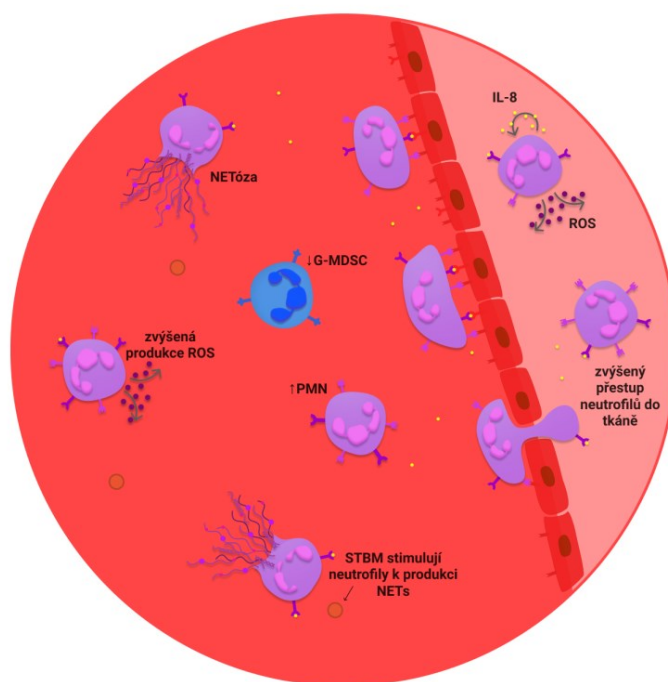
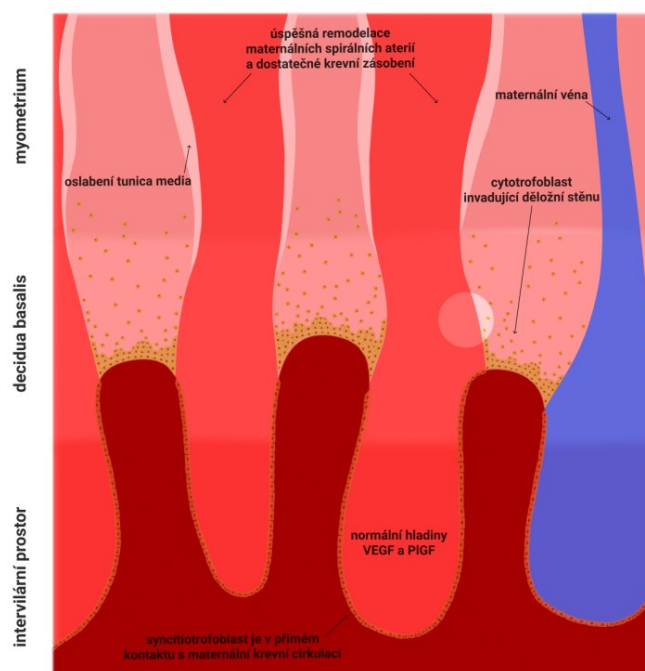
Příčinou suboptimální remodelace spirálních arterií u PE by mohla být abnormální diferenciací cytotrofoblastických buněk způsobená neschopností buněk zvýšit expresi antigenů specifických pro pozdní fázi diferenciací, jako integrin  $\alpha 1$  a matrixová metaloproteináza 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) (Lim *et al.*, 1997). Neúspěšnost přestavby spirálních arterií způsobí nedostatečné zásobení placenty kyslíkem. Související hypoperfuze má za následek zvýšení oxidativního stresu a následnou ischemii placenty, která má neblahé následky pro růst plodu.

Oxidativní stres hraje v patologii tohoto onemocnění velice důležitou roli, neboť u těhotenství komplikovaných PE dochází k systematickému zánětu a zvýšení koncentrace superoxidu, který má za důsledek dysfunkci endotelu (Mannaerts *et al.*, 2018) projevující se narušenou schopností cév reagovat a rozšířit se v závislosti na míře průtoku krve. Zvýšená hladina superoxidu také podněcuje ztuhlost arterií (Mannaerts *et al.*, 2018), což by mohlo být důvodem jejich neschopnosti remodelace a dostatečného placentálního zásobování. Zvýšení oxidativního stresu bylo u žen s PE pozorováno už v raném stádiu těhotenství (D'Souza *et al.*, 2016).

## Preeklampsie



## Normální těhotenství



**Obrázek 1** Schéma úspěšné remodelace spirálních arterií u normálního těhotenství a její nedostatečnosti v průběhu těhotenství komplikovaného preeklampií. Následkem snížení průtoku krve do placenty dochází k její ischemii, zánětlivé odpovědi a zvýšení oxidativního stresu. Do maternální cirkulace se uvolňují angiogenní faktory (solubilní fms-like tyrosin kináza, sFlt-1 a solubilní endoglin, sEng) a syncytiotrofoblast derivované mikročástice (syncytiotrophoblast microparticles, STBM). Do postižené placenty migruje značné množství neutrofilů, které jsou navíc snadněji aktivovatelné, ve zvýšené míře podstupují NETózu a produkují volné kyslíkové radikály (ROS), čímž přispívají k dalšímu zvýšení zánětlivé odpovědi. Naopak v průběhu normálního těhotenství migrují na fetu-maternální rozhraní G-MDSC, které přispívají k navození tolerance a supresi T-lymfocytů pomocí exprese programmed death-ligand 1 (PD-L1), indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) a arginázy 1 (Arg-1).

### 2.2.2. Maternální fáze

Jako hlavní faktor hrající roli v patogenezi maternální fáze PE se nabízí rozpustná fms-like tyrosin kináza 1 (sFlt-1), která rozpoznává angiogenní faktory vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a placentální růstový faktor (PlGF). Snížení koncentrace PlGF a VEGF v krvi vyvázáním pomocí sFlt-1 inhibuje růst krevních cév. Jedním z hlavních producentů sFlt-1, jejíž hladiny korelují se závažností onemocnění, se u žen s PE ukázala být hypoxická placenta (Maynard *et al.*, 2003). Zvýšená hladina sFlt-1 a snížená hladina PlGF poukazuje na následný rozvoj PE (Levine *et al.*, 2004).

Na patogenezi maternální fáze PE se společně s sFlt-1 podílí i rozpustný TGF- $\beta$  receptor endoglin (soluble endoglin, sEng) (Venkatesha *et al.*, 2006), který brání vazbě TGF- $\beta$  na receptory endoteliálních buněk a tím snižuje jejich schopnost indukovat vasodilataci. Trofoblastické buňky izolované z PPE produkují zvýšené množství sFlt-1 a sEng v porovnání s buňkami zdravých kontrol (Gu *et al.*, 2008).

Syncytiotrofoblast, který je v přímém kontaktu s mateřskou krví, odvrhuje velké množství mikročástic (syncytiotrophoblast microparticles, STBM), které hrají důležitou roli v indukci zánětu. Množství STBM se zvyšuje v cirkulaci žen postižených PE (Venkatesha *et al.*, 2006). Za zmínku stojí, že nerozpustné formy antiangiogenních faktorů zmiňovaných výše (sFlt-1 a sEng) byly pozorovány v asociaci s STBM (Tannetta *et al.*, 2013), což by mohlo dále prohlubovat patologii spojenou s nedostatkem volného VEGF. STBM mimo jiné stimulují neutrofilů k produkci superoxidových radikálů (Aly *et al.*, 2004) a společně s interleukinem-8 (IL-8) u nich indukují tvorbu NETs (Gupta *et al.*, 2005) (viz Obrázek 1).

### 2.3. Symptomy a klinické příznaky

Mezi symptomy a komplikace PE podněcené faktory produkovanými ischemickou placentou patří hypertenze, poškození ledvin a s ním související proteinurie, trombocytopenie, epigastrická bolest, dysfunkce jater, HELLP (Hemolysis-Elevated Liver enzyme-Low Platelets) syndrom, poruchy zraku, bolesti hlavy a záchvaty křečí \*(Lambert *et al.*, 2014).

#### 2.3.1. Hypertenze

Hypertenze v těhotenství je definovaná jako systolický tlak  $\geq 140$  mm Hg a/nebo diastolický tlak  $\geq 90$  mm Hg (Brown *et al.*, 2000). Faktory zvyšujícími riziko těhotenské hypertenze a jejího případného přechodu v PE jsou předčasná placentární kalcifikace, nadměrné zvýšení hmotnosti (Chen *et al.*, 2017) a obezita, vysoký věk, rodinná historie hypertenze a vysoký krevní tlak pacientky.

V případě, že zmíněné rizikové faktory předcházejí prvnímu těhotenství komplikovanému PE, může se hypertenze vyvinout i *postpartum* (Jääskeläinen *et al.*, 2018).

### 2.3.2. Proteinurie

Jedním z ukazatelů PE je proteinurie  $\geq 0,3$  g/den po 20. týdnu těhotenství. Zvýšené hladiny sFlt-1 produkované hypoxickou placentou zabraňují vazbě rozpustného VEGF na endoteliální buňky a podocyty (Henaoui *et al.*, 2013). Následkem nedostatku volného VEGF dochází k poškození filtrační bariéry ledvin a zvýšenému přestupu bílkovin do moči.

## 2.4. Klasifikace

Preeklampsii členíme na základě závažnosti symptomů, patogeneze a doby výskytu. Za hlavní klasifikaci je ale považováno rozdělení PE na časnou a pozdní.

### 2.4.1. Časná preeklampsie

Tato forma se klinicky manifestuje před nebo v průběhu 34. týdne těhotenství. Na rozdíl od pozdní PE (late-onset, loPE) je časná PE (early-onset, eoPE) většinou komplikovaná nitroděložní růstovou retardací, která má nepříznivé důsledky pro vyvíjející se plod (van der Merwe *et al.*, 2010), a vykazuje jasnou placentální patologii.

V důsledku nedostatečného krevního zásobení v třetím trimestru těhotenství dochází u pacientek diagnostikovaných s eoPE k nesprávnému vývoji placenty, projevujícím se menší velikostí PPE a zvýšeným stupněm nekrózy v porovnání se vzorky placent zdravých žen (van der Merwe *et al.*, 2010).

Ukazatelem pro případný rozvoj eoPE se ukázala být nízká koncentrace cirkulujícího PIGF během časného stádia těhotenství (Levine *et al.*, 2004).

### 2.4.2. Pozdní preeklampsie

Pokud dojde k rozvoji PE po 37. týdnu těhotenství, bude pravděpodobně diagnostikována jako pozdní PE. Placenty loPE povětšinou nevykazují patologii při běžné klinicko-patologické prohlídce a více se podobají placentám zdravých matek (van der Merwe *et al.*, 2010). Toto pozorování poukazuje na rozdílnou patogenezi eoPE a loPE. LoPE vychází spíše z nesouladu mezi metabolickými potřebami plodu a nedostatečným maternálním zásobováním na konci těhotenství.

Nejlepším markerem pro predikci loPE v časném stádiu těhotenství (8. -22. týden) se ukázal nadbytek maternální plasmatické MMP-7. Pro pozdější stádium těhotenství (po 22. týdnu) se jako predikční marker nabízí nízká plasmatická hladina růstového faktoru PIGF (Erez *et al.*, 2017).

## 2.5. Komplikace

### 2.5.1. Těžká preeklampsie, eklampsie a preeklampsie *postpartum*

Eklampsie je život ohrožující komplikace, ve kterou může vyústit závažnější forma PE, těžká preeklampsie. Incidence těžké PE se liší v závislosti na dostupnosti lékařské péče. Například v Yorkshiru v Anglii byla určena na 0,5 % (Tuffnell *et al.*, 2005) v porovnání se studiemi provedenými v Nigérii a Zimbabwe, kde byla incidence 1,7 % (Ajah *et al.*, 2016) a 1,3 % (Ngwenya, 2017) ze všech porodů. V Nigérii byla těžká PE a eklampsie stanovena jako hlavní příčina maternální i perinatální morbidity a mortality. Riziko eklampsie je zvýšené u prvorodiček, u těhotných s cévními problémy (vysoký krevní tlak, cukrovka, nefróza) nebo u pacientek s vícečetným těhotenstvím (větší placenta). Projevuje se záchvatem tonicko-klonických křečí a může přejít až do bezvědomí.

*Status eclampticus* označuje nakupení eklamptických záchvatů, doprovázených kómatem. *Status eclampticus* může proběhnout i bez křečí a v tom případě upadá žena přímo do kómatu označovaného jako *eclampsia sine eclampsia*. Závažnost eklampsie se dále prohlubuje s rostoucím množstvím průvodních komplikací jako plicní edém, kardiální a hepatorenální selhání, diseminovaná intravaskulární koagulace, syndrom akutní dechové tísně, odchlípení sítnice, edém mozku, cerebrální krvácení, hypertonus děložní s rupturou placenty nebo hypoxie plodu. V případě propuknutí eklampsie je nutné pacientce zajistit dýchací cesty, snížit hypertenzi, tlumit křeče a co nejrychleji provést porod. K tomu se bohužel přistupuje i v situaci, kdy plod ještě není zralý.

U pacientek s těžkou PE byla pozorována výrazná leukocytóza s hlavním podílem neutrofilů v porovnání s ženami bez těhotenských komplikací a hladina leukocytů zůstala zvýšena i 48 hodin po porodu (Canzoneri *et al.*, 2009).

*Postpartum* PE označuje komplikace postihující ženy až v době po narození jejich potomka. Symptomy, hypertenze a proteinurie, jsou analogické “klasické” PE. Do 4 týdnů po porodu se dále mohou projevit bolesti hlavy, změny vidění, zvýšený krevní tlak nebo křeče (Yancey *et al.*, 2011).

### 2.5.2. HELLP syndrom

HELLP syndrom je charakterizován zvýšením oxidativního stresu, způsobeným nerovností mezi peroxidací lipidů a antioxidačními ochrannými mechanismy. Tato dysbalance podněcuje vzestup hladiny volných radikálů, které dále ničí buňky a ohrožují endotel (Mentese *et al.*, 2018).

### 3. Neutrofily

Polymorfonukleární neutrofily (PMN), zkráceně neutrofily, představují hlavní subpopulaci leukocytů cirkulujících v krvi a zastávají důležitou roli ve funkci přirozené imunity. V případě zánětu jako první z bílých krvinek pronikají do místa postižení, kde iniciují imunitní odpověď a přispívají k znovunastolení rovnováhy. Bojují proti velkému množství infekčních agens (bakterie, protozoa, plísňe), vyzbrojeny mnoha účinnými antimikrobiálními molekulami.

Neutrofily byly dlouho považovány za krátce žijící terminálně diferencované buňky s definovanou funkcí v organismu včetně podpory zánětlivé odpovědi a nepředpokládalo se, že se na tomto dogmatu něco změní. Proto byly dlouhá léta spíše na pozadí zájmu výzkumu buněk, zprostředkujících složité mechanismy zajišťující dostatečnou a zároveň adekvátní imunitní odpověď. V poslední době se pozornost k neutrofilům začala vracet, neboť se ukázalo, že vykazují značnou plasticitu a hrají důležité role v modulaci imunitní odpovědi. Zjistilo se, že mohou komunikovat nejen s buňkami přirozené imunity, ale jsou schopné podporovat i rozvoj adaptivní imunity.

Současné studie také podporují tvrzení, že neutrofily jsou schopné přežívat na periférii až několik dní (Pillay *et al.*, 2010), i když byly v tomto ohledu vysloveny určité pochybnosti. Vyvinuty byly postupy umožňující dlouhodobější kultivaci neutrofilů *in vitro* pro kokultivační a funkční studie.

Znalosti o konečné diferenciaci PMN také doznaly značné změny, hlavně ve výzkumu neutrofilů asociovaných s nádory. Zde se objevilo několik subpopulací neutrofilů, které mohou jak inhibovat, tak podporovat růst a vývoj nádoru. Na základě provedených studií se začal sledovat příspěvek a funkce neutrofilů a jejich subpopulací v dalších patologiích.

Ve světle těchto pozorování jsem se proto ve své práci zaměřila na funkce, mechanismy účinků neutrofilů a jejich jednotlivých subpopulací u PE.

#### 3.1. Vývoj

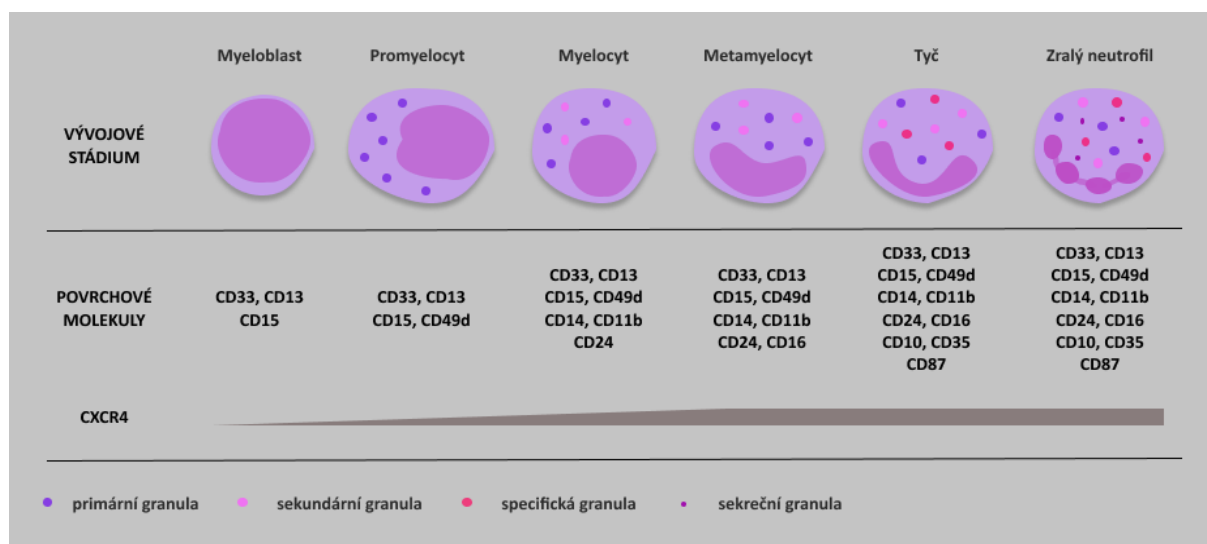
Místem vývoje neutrofilů je aktivní kostní dřeň. Diferencují se z hematopoetických kmenových buněk, přesněji z prekursorů myeloidní leukocytární linie. Denně kostní dřeň produkuje až  $10^{11}$  těchto buněk tvořících okolo 70 % všech cirkulujících leukocytů v krvi.

##### 3.1.1. Vývojová stádia

PMN se vyvíjí v 6 definovaných stádiích, která se liší expresí povrchových znaků, přítomností granul specifických pro neutrofily, velikostí a morfologií jádra.

Stádia vývoje PMN z hematopoetické kmenové buňky zahrnují myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, nezralou formu neutrofilu označovanou jako tyč a zralý segmentovaný neutrofil.

Neutrofily během vývoje mění svou buněčnou a jadernou morfologii (viz Obrázek 2). Rané prekurzory neutrofilů mají vysokou transkripční aktivitu, proto mají jádra velká se stále přítomnými jadérky. Sám název polymorfonukleární naznačuje, že během zrání dochází ke značné kondenzaci a segmentaci jádra. Kondenzace jádra má za následek poměrně nízkou transkripční aktivitu zralých buněk, která se ovšem může měnit v závislosti na lokalizaci a míře aktivace neutrofilů uvolněných z kostní dřeně (Lakschevitz *et al.*, 2015).



**Obrázek 2** Schematické znázornění buněčné a jaderné morfologie jednotlivých vývojových stádií neutrofilů a povrchových molekul (Elghetany *et al.*, 2004) exprimovaných jednotlivými prekurzory PMN.

Také složení povrchových molekul se během vývoje mění (viz. Obrázek 2). Buňky získávají široké portfolio receptorů a ligandů, které následně definují jejich osud v imunitní reakci. Chemokinový receptor CXCR4 slouží k zadržení a zabránění předčasného vycestování zralých PMN vazbou na stromální buněčně derivovaný faktor 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF1) exprimovaný buňkami kostní dřeně.

### 3.1.2. Cytokiny podporující vývoj neutrofilů

Hlavním regulátorem granulopoézy je faktor stimulující granulocytární kolonie (G-CSF), který indukuje diferenciaci CD34+ granulocytárních prekurzorů. PMN exprimují na svém povrchu velké množství receptoru pro tento faktor (G-CSFR).

Na myším modelu bylo ukázáno, že přes dráhu zprostředkovanou IL-17A a G-CSF výrazně ovlivňuje novorozeneckou granulopoézu mikrobiota a jí stimulované intestinální buňky (Deshmukh *et al.*, 2014). Mikrobiota mimo jiné reguluje stárnutí neutrofilů přes toll-like receptory (TLR) a jejich adaptorový protein MyD88 (Zhang *et al.*, 2015). G-CSF je také produkován na fetu-maternálním rozhraní (FMR), a to hlavně placentou v prvním trimestru těhotenství (Shorter *et al.*, 1992).

### 3.2. Role v zánětlivé odpovědi

Na zdrojové místo infekce jsou PMN přilákány řadou solubilních faktorů (chemokinů a cytokinů) produkovaných buňkami aktivovanými poškozením tkáně, například makrofágy nebo epiteliálními buňkami.

Endotel v blízkosti postiženého místa exprimuje po stimulaci prozánětlivými faktory adhezivní molekuly, které napomáhají neutrofilům navázat se na stěnu cévy a proniknout do tkáně.

#### 3.2.1. Faktory ovlivňující migraci neutrofilů

Neutrofilů jsou stimulovány k vycestování z kostní dřeně řadou faktorů produkovaných nejen makrofágy ale i dalšími buňkami aktivovanými přítomností patogenních organismů a jimi způsobeného poškození tkáně. Choroboplodné mikroorganismy mohou také samy působit jako efektivní faktory pro chemotaxi neutrofilů.

Konstitutivní uvolňování zralých neutrofilů z kostní dřeně je indukováno G-CSF, který vyvolává snížení exprese CXCR4 (Kim *et al.*, 2006).

Další molekulou zajišťující migraci neutrofilů do postiženého místa je IL-8, jehož produkci PBMC indukuje lipopolysacharid (LPS), IL-1 $\beta$  a faktor nekrotizující nádory  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Matsushima *et al.*, 1988). Vazba IL-8 na chemokinový receptor CXCR1 nebo CXCR2 aktivuje u PMN řadu drah signální transdukce indukovaných jednotlivými podjednotkami malých heterotrimerních G-proteinů. Tyto dráhy zodpovídají jak za nukleaci aktinu a schopnost neutrofilů migrovat z kostní dřeně, tak za translaci proteinů a kontrolu transkripčních faktorů nukleárního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B), signálního transduktoru a aktivátoru transkripce 3 (STAT3) nebo  $\beta$ -kateninu (Waugh and Wilson, 2008).

Velmi potentními chemokiny jsou také fragmenty komplementu C5a a C3a, jejichž produkce v odpovědi na přítomnost patogenů je zprostředkována aktivací jedné ze tří možných komplementových kaskád. Jako účinné chemokiny slouží i leukotrien B<sub>4</sub>, faktor aktivující destičky nebo produkty degradace extracelulární matrix.

Mezi chemoatraktanty patogenního původu patří bakteriální peptidy jako formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) nebo složky bakteriální stěny (např. LPS).

#### 3.2.2. Průnik do tkáně

V krvi zdravého člověka je konstitutivně udržována určitá hladina cirkulujících neutrofilů, které přestupují do tkáně, likvidují patogeny a následně jsou pohlcovány makrofágy. Tato dynamická rovnováha zajišťuje udržení homeostázy organismu.

Přestup leukocytů do tkáně, jinak také nazvaný diapedéza, je víceukrokový mechanismus. Cévní endotel stimulovaný přítomností zánětlivých molekul produkovaných jak patogeny,



tak aktivovanými makrofágy exprimuje řadu adhezivních molekul, např. endothelial selectin (E-selectin), endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) nebo vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) (Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996). Vazba těchto molekul přes receptory na povrchu neutrofilů zajišťuje zachycení neutrofilu a jeho kutálení po cévní stěně. Těsná vazba dalších receptorů a adhezivních molekul zajistí pevné přichycení neutrofilu a následný prostup endoteliální stěnou do tkáně ve směru chemokinového gradientu.

### **3.3. Funkce**

Neutrofilů disponují účinnými mechanismy k eliminaci patogenních mikroorganismů, které ale musí být přísně regulovány, aby nedocházelo k neadekvátní reakci, následnému poškození tkáně a přidruženým patologiím. Na myším modelu bylo ukázáno, že neutrofilů mohou být i účinnými buňkami předkládajícími antigen (Abi Abdallah *et al.*, 2011), což naznačuje jejich schopnost komunikovat nejen s přirozenou, ale i s adaptivní imunitou.

#### **3.3.1. Fagocytóza**

Fagocytóza je základní zbraní PMN v boji proti patogenům. PMN mají schopnost pojmout velké množství mikroorganismů a buněčného odpadu do intracelulárních váček nazvaných fagozomy. Fagozomy následně v průběhu zrání splynou s lysozomy a neutrofilními granuly (Segal *et al.*, 1980), čímž vystaví svůj obsah antimikrobiálním peptidům, proteázám a hlavně toxickým kyslíkovým radikálům.

Podobně jako ostatní fagocytující buňky jsou neutrofilů vybaveny množstvím specializovaných receptorů k rozpoznání patogenní invaze a zánětlivého prostředí (Futosi *et al.* 2013). Patogeny rozeznávají jak v opsonizovaném tak v nativním stavu.

#### **3.3.2. NETóza**

Neutrofilní extracelulární pasti byly poprvé pozorovány a popsány v reakci na bakteriální infekci (Brinkmann *et al.*, 2004). Aktivované neutrofilů generují extracelulární vlákna, která se skládají z hladkých částí o průměru 15 až 17 nm, posetých globulárními doménami o průměru 30-50 nm. Vlákna se mohou dále navíjet do struktur dosahujících průměru až 100 nm. Ty jsou základem pro komplexní a flexibilní 3D strukturu. Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) ukázaly (Brinkmann *et al.*, 2007), že tato síť pokrývá plochu několika  $\mu\text{m}^2$ .

Elegantní pokus degradačního působení DNáz v porovnání s proteinázami (Buchanan *et al.*, 2006) prokázal, že hlavní strukturní složku NETs tvoří DNA (Brinkmann *et al.*, 2004). S NETs asociují také specifické proteiny z neutrofilních granul, mezi něž patří neutrofilní elastáza (NE), katepsin G, myeloperoxidáza (MPO) nebo laktoferrin a želatináza. Indukce formování NETs závisí na produkci ROS NADPH oxidázou (Fuchs *et al.*, 2007) a činnosti

peptidylarginin deiminázy 4 (PAD4) katalyzující hypercitrulinaci histonů a s ní spojené rozvolnění chromatinu (Wang *et al.*, 2009). MPO a NE také hrají důležitou roli v procesu formování NETs (Papayannopoulos *et al.*, 2010; Metzler *et al.*, 2011). Intragranulární ROS a jejich enzymatické zpracování MPO jsou klíčové pro PMA (phorbol myristate acetate) indukovanou produkci NETs (Björnsdottir *et al.*, 2015).

Jelikož NETs vykazují vysokou imunogennost a mohou způsobovat poškození tkáně (Wang *et al.*, 2018), pokud dojde k jejich aktivaci v nevhodné míře, musí být uvolňování důkladně regulováno. Bylo ukázáno, že neutrofily mají schopnost detekovat velikost mikrobů a podle toho vybrat adekvátní mechanismus k jejich eliminaci (Branzk *et al.*, 2014).

Literatura definuje NETózu jako jedinečný typ buněčné smrti (Fuchs *et al.*, 2007) s mechanismem odlišným od apoptózy a nekrózy a specifickým pro neutrofily. Detailnější studie z posledních let ale přicházejí s novými poznatky a výjimkami z dříve přijímané koncepce. Popsány byly nové formy NETózy nazvané ApoNETóza a vitální NETóza. ApoNETóza zahrnuje současnou aktivaci drah apoptózy a NETózy v reakci na vysokou dávku UV záření (Azzouz *et al.*, 2018). Proces uvolnění NETs, při němž nedochází ke smrti neutrofilu, je nazýván vitální NETóza (Yousefi *et al.*, 2009).

### 3.3.3. Produkce volných kyslíkových radikálů a degranulace

Volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species, ROS) představují vysoce toxické molekuly produkované NADPH oxidázou, která je lokalizována na membránách granul. V případě fagocytózy dochází k poskládání NADPH oxidázy na membráně fagozómu a produkci ROS přímo do lumen vaku. Proces uvolnění neutrofilních granul do extracelulárního prostoru v odpověď na stimulaci nejčastěji patogenními mikroorganismy nebo dalšími prozánětlivými molekulami se nazývá degranulace. Složení obsahu jednotlivých granul (viz. Tabulka 1).

● primární granula	● sekundární granula	● specifická granula	● sekreční granula
myeloperoxidáza	laktoferin		
elastáza	lysozym		
katepsin G	cytochrom b558	lysozym	cytochrom b558
proteináza 3	kolagenáza	cytochrom b558	CD11b
defensiny	želatináza	želatináza	CD18
lysozym	CD11b	CD11b	CR1
	CD18	CD18	alkalická fosfatáza
	fMLP-R	acetyl transferáza	fMLP-R

**Tabulka 1** Vybrané molekuly vyskytující se v jednotlivých typech neutrofilních granul (cluster of differentiation CD, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin receptor fMLP-R, complement receptor CR).

### 3.4. Subpopulace neutrofilů

Zbořením mýtu o jasné homogenitě zralých PMN se otevřelo široké okno do nepřeberného množství rozličných subpopulací neutrofilů. Ukázalo se, že některé fenotypy neutrofilních subpopulací jsou schopné velice efektivně potlačovat imunitní odpověď a napomáhat nastolení imunitní tolerance. Deregulace v proporčním zastoupení jednotlivých subpopulací byla asociována s těžkými komplikacemi (Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

#### 3.4.1. Neutrofily s vysokou hustotou

Majoritní populací jsou „klasické“ zralé neutrofily nazvané vysoko-hustotní neutrofily (high-density neutrophil, HDN), neboť při gradientové centrifugaci sedimentují na dno zkumavky společně s erytrocyty.

#### 3.4.2. Neutrofily s nízkou hustotou

Středobodem výzkumů z posledních let se stala role neutrofilů v rakovinném bujení. Byla objevena a popsána (Sagiv *et al.*, 2015) subpopulace nízko-hustotních neutrofilů (low-density neutrophils, LDN), která vykazuje imunosupresivní vlastnosti a akumuluje se v pacientech v závislosti na progresi nádorového bujení. LDN byly nazvány na základě jejich kolokalizace s frakcí mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) při centrifugaci s využitím hustotního gradientu.

#### 3.4.3. Subpopulace s angiogenními vlastnostmi

Studie sledující migraci neutrofilů za VEGF-A objevila distinktní subpopulaci cirkulujících neutrofilů exprimujících pozdní aktivační antigen 4 (very late antigen-4, VLA-4) integrin (CD49d). CD49d<sup>+</sup> populace měla vyšší zastoupení CXCR4 a VEGFR1 na buněčném povrchu než CD49d<sup>-</sup> PMN, a byla tedy definována jako CD49d<sup>+</sup>VEGFR1<sup>high</sup>CXCR4<sup>high</sup> subpopulace neutrofilů s proangiogenními vlastnostmi (Massena *et al.*, 2015).

Autoři studie také ukázali, že tato populace má zvýšenou chemokinesi v závislosti na gradientu VEGF-A, mimo jiné jsou tyto buňky schopné urazit delší vzdálenosti a pohybovat se rychleji v porovnání s CD49d<sup>-</sup> buňkami. Lidské CD49d<sup>+</sup> neutrofily vykazovaly vyšší proangiogenní aktivitu měřenou produkcí proteáz (např. MMP-9) (Massena *et al.*, 2015). Deplece VLA-4 snížila množství neutrofilů v hypoxických místech a množství nově vytvořených krevních cév jasně naznačuje jejich roli v angiogenezi.

Nabízí se otázka, zda se tato populace také vyskytuje na FMR a přispívá k vaskularizaci svými proangiogenními vlastnostmi a zda není tato funkce u žen s PE narušena.

#### 3.4.4. Myeloidní supresorové buňky

Myeloidní supresorové buňky představují heterogenní populaci nezralých buněk odvozených z myeloidní linie.

Hladina MDSC v krvi se významně zvyšuje v přítomnosti nádoru, proto jsou zkoumány hlavně v asociaci s nádorovým bujením (Sagiv *et al.*, 2015). Cytokiny podporující expanzi a proliferaci MDSC jsou IL-6, IL-10 a TGF- $\beta$  \*(Chen *et al.*, 2017).

Podle exprese povrchových znaků se rozlišují na M-MDSC, které se fenotypem přibližují monocytům, a na G-MDSC vykazující fenotyp obdobný neutrofilům, kterým se dále budu věnovat. Neboť právě G-MDSC byly asociovány s buněčnými změnami v těhotenství (Köstlin *et al.*, 2014) a s jeho komplikacemi (Wang *et al.*, 2018). V myším modelu exprimují G-MDSC povrchové znaky CD11b<sup>+</sup> LY6G<sup>+</sup>LY6C<sup>LOW</sup> na rozdíl od lidské linie G-MDSC, která nemá Gr-1 a definuje se jako CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup> (Youn *et al.*, 2008). G-MDSC vykazují imunoregulační vlastnosti a schopnost navození imunitní tolerance pomocí exprese arginázy 1 (Arg-1), indukovatelné NO syntázy (iNOS), indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) a produkce ROS. Arg-1 a iNOS jsou enzymy depletující L-arginin, aminokyselinu esenciální pro řádnou expresi CD3 $\zeta$  řetězce na T lymfocytech (Rodriguez *et al.*, 2002). IDO katabolizuje aminokyselinu tryptofan esenciální pro správný průběh G1 fáze buněčného cyklu T lymfocytů (Munn *et al.*, 1999). MDSC ale dokáží regulovat buňky i přímou buněčnou interakcí, například expresí inhibičního PD-L1 (programmed death-ligand 1) (Lu *et al.*, 2016), který indukuje apoptózu T lymfocytů vazbou na jejich povrchový receptor PD-1 (programmed cell death 1).

Současné studie poukazují na zásadní roli G-MDSC při vzniku a udržení imunitní tolerance na FMR a potlačení proliferace potenciálně aloreaktivních T lymfocytů, aby nedošlo k odhojení plodu a spontánnímu potratu. Hladiny G-MDSC vykazují výrazné zvýšení v placentách zdravých těhotných žen, kde efektivně potlačují proliferaci cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a polarizují pomocné CD4<sup>+</sup> T buňky směrem k Th2 imunitní odpovědi v porovnání s placentami žen, u kterých došlo ke spontánnímu potratu (Köstlin *et al.*, 2016). Nedostatečná proliferace a efektivita G-MDSC pravděpodobně způsobí převahu prozánětlivé imunitní odpovědi a s ní spojenými komplikacemi na FMR, jako jsou spontánní potraty nebo PE. Významná expanze G-MDSC je pozorovatelná i v periferní krvi (peripheral blood, PB) těhotných žen (Köstlin *et al.*, 2014) a pupečnickové krvi (cord blood, CB) novorozenců (Rieber *et al.*, 2013; Köstlin *et al.*, 2017). Tato pozorování byla obdobná i na myším modelu indukce tolerance na FMR (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2017). Snížené hladiny G-MDSC by mohly být potenciálně vhodným včasným prognostickým znakem poukazujícím na hrozbu rozvoje těhotenských komplikací. Pro potvrzení této hypotézy musí ale být proveden další detailní výzkum.

## 4. Role neutrofilů u preeklampsie

### 4.1. Migrace neutrofilů do placenty

Těhotenství způsobuje u matky zvýšení fyziologického stresu a FMR tedy představuje místo přirozené migrace neutrofilů. U pacientek s PE v porovnání se zdravými rodičkami byla pozorována zvýšená infiltrace neutrofilů, korelující se závažností onemocnění (Canzoneri *et al.*, 2009). Těhotenství přirozeně provází mírná neutrofilie, mimo jiné způsobena narušením spontánních apoptotických drah aktivovaných PMN s výraznějším opožděním u buněk izolovaných z PPE (von Dadelszen *et al.*, 1999). Těhotenství je také definováno určitou hladinou zánětu zvýšenou u pacientek s PE (Ramma *et al.*, 2012).

### 4.2. Aktivace neutrofilů

Deregulace míry aktivace neutrofilů migrujících do PPE v kombinaci s jejich zvýšenou koncentrací na FMR (viz. Obrázek 1) by mohla vést k poškození tkáně, uvolnění množství prozánětlivých molekul a klinické manifestaci PE. Existuje řada molekul, které slouží jako ukazatele aktivace neutrofilů (zejména enzymy a proteiny obsažené v neutrofilních granulách, uvolňované při degranulaci nebo v asociaci s NETs).

#### 4.2.1. Markery aktivace neutrofilů

Jedním ze znaků pozorovaných v souvislosti s aktivací neutrofilů jsou defensiny, jejichž zvýšená koncentrace byla pozorována v plasmě pacientek s PE (Prieto *et al.*, 1997) a korelovala s mírou zánětu u těžké formy PE (Ramma *et al.*, 2012).

Jako další možné ukazatele aktivace PMN se nabízí NE a MPO, které tvoří společně s defensiny obsah primárních granul (viz. Tabulka 1). Pozorován byl značný vzestup hladiny NE v krevní cirkulaci žen s hypertenzí oproti hladině v PB zdravých dobrovolnic (Greer *et al.*, 1991). Hladiny MPO byly významně zvýšeny jak v maternální cirkulaci žen s PE tak v PPE (Gandley *et al.*, 2008).

U žen s PE byla také pozorována zvýšená koncentrace kalprotektinu, který naznačuje aktivaci buněk myeloidní linie (Holthe *et al.*, 2005). Kalprotektin je jedním z cytosolických proteinů asociovaných s NETs (Urban *et al.*, 2009) přítomných v PPE v nadbytku (Marder *et al.*, 2016).

Další enzym produkovaný neutrofilů, jehož hladiny narůstají u žen s PE, se nazývá lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) (Kim *et al.*, 2013). Společně s prokalcitoninem hladiny NGAL korelují se závažností PE, a proto byla tato dvojice markerů navržena jako potenciální prognostický znak rozvoje PE (Artunc-Ulkumen *et al.*, 2015).

#### 4.2.2. Komplement

Jednu ze zbraní humorální části přirozené imunity představuje komplement, který má schopnost indukovat migraci a aktivaci neutrofilů. Spuštění komplementových kaskád a následné uvolnění chemotaktických faktorů (C3a, C5a) u PE by tedy mohlo přispívat ke zvýšenému výskytu neutrofilů na FMR.

Identifikovány byly 3 jednonukleotidové polymorfismy (single-nucleotide polymorphism, SNP) v genu C3 vyskytující se u pacientek s těžkou PE (Lokki *et al.*, 2017). Zvýšené hodnoty C3a v raném stádiu těhotenství poukazují na možný rozvoj PE v pozdějším stádiu těhotenství (Lynch *et al.*, 2011, 2012), což by mohlo rovněž souviset se zvýšenou aktivitou neutrofilů. Studie provedená na myším modelu PE prokázala, že aktivace komplementu předchází infiltraci neutrofilů do placenty a inhibice této aktivace zabraňuje omezení růstu plodu a potratům (Gelber *et al.*, 2015).

#### 4.2.3. TNF- $\alpha$

K produkci TNF- $\alpha$  neutrofily dochází při jejich aktivaci. Přítomnost receptoru pro TNF- $\alpha$  na povrchu PMN vytváří pozitivní autokrinní smyčku, která zajišťuje vysokou koncentraci neutrofilů v poškozeném místě. Nabízí se otázka, zda nejsou neutrofily u žen s PE stimulovány k vyšší produkci TNF- $\alpha$ .

Na potkaním modelu bylo ukázáno (Cotechini *et al.*, 2014), že indukce zánětu podáním nízké dávky LPS u těhotných samic zvýšila hladiny TNF- $\alpha$  podporující nesprávnou remodelaci spirálních arterií a následné komplikace podobné PE. Rozsáhlá studie spojující funkci komplementu a neutrofilů na myším modelu PE uvedla, že deplece neutrofilů snížila hladiny TNF- $\alpha$  a blokování jeho aktivity zlepšilo mnohé komplikace spojené s preeklampií (Gelber *et al.*, 2015).

#### 4.2.4. Faktory produkované placentou

Placenta tvoří velké množství molekul a faktorů využívaných ke komunikaci plodu s matkou na FMR. Tyto molekuly také regulují imunitní systém a hrají významnou roli v aktivaci neutrofilů migrujících do tohoto prostředí. Neutrofily vystavené médiu derivovanému z PPE produkovaly zvýšené hladiny ROS a exprimovaly více adhezivních molekul CD62L a CD11b (Wang *et al.*, 2001). CD11b interaguje s integrinem CD11 vystavovaným na povrchu aktivovaného epitelu.

#### 4.3. Produkce ROS a oxidativní stres

Produkce ROS neutrofily se v průběhu normálního těhotenství snižuje (Crocker *et al.*, 1999; Lampé *et al.*, 2011a) pravděpodobně za účelem regulace a prevence tkáňového poškození.

Studie sledující produkci ROS u neutrofilů v PPE nejsou jednotné, ale udržuje se určitý trend v názoru, že neutrofily u pacientek s PE nevykazují tuto supresi a že mají  $O_2^-$  produkci stejnou (Lampé *et al.*, 2011b) nebo zvýšenou (Tsukimori *et al.*, 2005) v porovnání s neutrofily žen zdravých a netěhotných. Tato narušená produkce ROS by mohla přispívat k oxidativnímu stresu.

Zvýšení oxidativního stresu v placentální tkáni u PE bylo ukázáno jak u pacientek s PE (Sikkema *et al.*, 2001) tak na potkaním modelu placentální ischemie (Sedeek *et al.*, 2008). U těžké formy PE byla dokázána zvýšená degranulace a s ní související uvolnění ROS, které koreluje s mírou zánětlivé odpovědi (Ramma *et al.*, 2012). Aktivované neutrofily izolované z krve pacientek s PE produkují větší množství superoxidu v porovnání s neutrofily získaných z krve zdravých žen (Aly *et al.*, 2004). Jedním z mechanismů patogenního působení ROS by mohla být jejich reakce s oxidem dusnatým (NO) za vzniku peroxynitritu ( $ONOO^-$ ). NO je potentním vazodilatátorem, proto by jeho nedostatek mohl způsobovat jak znesnadnění průtoku krve spirálními artériemi na FMR a tím ischemii placenty, tak zvýšení krevního tlaku v maternální cirkulaci a tím podporovat hypertenzi u matky.

#### **4.4. Asociace neutrofilů s angiogenními a antiangiogenními faktory**

VEGF a sFlt-1 jsou klíčovými hráči v rozvoji maternální fáze PE, jak bylo diskutováno výše. Některé studie mechanismu PE u lidí naznačovaly, že množství neutrofilů a hladiny antiangiogenních faktorů jsou nezávislé (Ramma *et al.*, 2012). Na myším modelu a v *in vitro* studii se ale ukázala jasná provázanost neutrofilů a jejich vlivu na snížení VEGF (Gelber *et al.*, 2015). Neutrofily by tedy mohly přímo regulovat hladiny tohoto faktoru a tím přispívat k patologii PE. Neutralizace VEGF a TGF- $\beta$  navíc zesiluje expresi adhezivních molekul epiteliálními buňkami, která podporuje zvýšený prostup leukocytů a tedy i PMN do tkáně (Walshe *et al.*, 2009).

#### **4.5. NETs v patogenezi preeklampsie**

IL-8 produkovaný aktivovanými endoteliálními buňkami stimuluje neutrofily k produkci NETs, které ale při dlouhodobé kokultivaci navozují poškození buněk endotelu (Gupta *et al.*, 2010). Bylo ukázáno, že exprese IL-8 se zvyšuje u pacientek s PE a pozitivně koreluje se závažností onemocnění (Sun *et al.*, 2016), což by mohlo souviset s velkým množstvím NETs v PPE (Marder *et al.*, 2016).

Efektivním ukazatelem deregulované aktivace NETózy by mohla být hladina volné cirkulující DNA (cell free DNA, cfDNA), jejíž koncentrace je zvýšena v plasmě pacientek s PE (Rafaeli-Yehudai *et al.*, 2018). U některých onemocnění už koncentrace cfDNA společně s MPO jako biomarker slouží (např. diabetes typu 2) (Miyoshi *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2018).

Komplexy MPO a cfDNA se v průběhu normálního těhotenství také zvyšují a nejvýrazněji se toto zvýšení projevuje v séru pacientek s PE (Sur Chowdhury *et al.*, 2016).

NETs mají schopnost indukovat koagulační kaskádu a vznik krevních sraženin (Fuchs *et al.*, 2010). Tuto indukční vlastnost potvrdily i studie trombocytózy provedené na myším modelu (Brill *et al.*, 2012). To by mohlo dále omezovat průtok krve spirálními artériemi a okysličování placenty. Jednotlivé komponenty NETs mají velký vliv na indukci zánětlivé odpovědi. Samotná DNA by mohla být zdrojem autoprotilátek, neboť citrulinované histony by mohly být endogenním antigenem (Khandpur *et al.*, 2013). Prokázány u PE ale byly pouze protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA) (Shaarawy *et al.*, 1997), protilátky proti citrulinovaným proteinům (ACPA) u PE měřeny nebyly. Protilátky ANCA by mimo jiné mohly napomáhat glomerulárnímu poškození ledvin souvisejícímu s proteinurií u PE. V tomto ohledu ale byla provedena pouze jedna studie a to v roce 1997 (Shaarawy *et al.*, 1997), pro potvrzení nebo naopak vyvrácení těchto spekulací by proto byly potřeba novější studie.

#### **4.6. Vliv neutrofilů na rozvoj hypertenze**

Podobnost potkaního modelu placentální ischemie (reduction in uterine perfusion pressure, RUPP) a RUPP indukované hypertenze s PE umožnila studium procesů vedoucích od redukováného placentálního zásobení až k manifestaci nemoci u matky. Předmětem výzkumu je také asociace a propojení těchto procesů s imunitním systémem a PMN. Placentální ischemie zvyšuje hladiny ROS (Sedeek *et al.*, 2008), naznačující významnou roli oxidativního stresu v indukci hypertenze. Vliv neutrofilů na hladiny oxidativního stresu byl už diskutován výše. Za zmínku ale stojí, že jedním z markerů oxidativního stresu zvýšeného u RUPP potkanů byla i MPO (Sedeek *et al.*, 2008). To by mohlo poukazovat na roli neutrofilů a jejich nadměrné aktivity v indukci hypertenze asociované s placentální ischemií.

Jasná provázanost byla prokázána u RUPP, kde deplece neutrofilů značně regulovala zvýšení arteriálního tlaku (Regal *et al.*, 2015). U žen s PE byla pozorována zvýšená infiltrace neutrofilů v endotelu a také hladkém svalstvu subkutánních cév (Leik *et al.*, 2004). Výsledky ohledně hladin MPO u žen s PE v porovnání se zdravými těhotnými ženami jsou dosti nejednotné, neboť některé výzkumné týmy rozdíl v hladinách MPO nepozorovaly (Bowen *et al.*, 2001) nebo prokázaly výrazné zvýšení aktivity MPO pouze u pacientek s eklampsií (Noyan *et al.*, 2006). Nejaktuálnější studie pozorovala u žen s PE vysoké koncentrace neutrofilů uvolňujících značné množství MPO (Shukla *et al.*, 2015), což by mohlo být faktorem v rozvoji oxidativního stresu a následné hypertenze. Tato studie také ukázala, že cévy obézních žen jsou podobně jako cévy žen s PE místem soustředění neutrofilů a MPO, což naznačuje rizikovost obezity v mechanismu rozvoje PE. Pro predikci PE ale MPO není vhodným kandidátem (Rocha-Penha *et al.*, 2017).



#### **4.7. Modulace imunitní odpovědi neutrofilů**

U pacientek s PE byly pozorovány nedostatky a modifikace imunoregulačních schopností neutrofilů. *Ex vivo* stimulace neutrofilů IFN- $\gamma$  prokázala schopnost neutrofilů potlačit proliferaci lymfocytů pomocí exprese PD-L1 (de Kleijn *et al.*, 2013). Narušení drah PD-1/PD-L1 bylo u žen s PE pozorováno (Meggyes *et al.*, 2019), ale studie se nezaměřovala na roli neutrofilů v těchto drahách.

Neutrofilů stimulované hormony produkovanými v těhotenství jsou schopné indukovat v T buňkách fenotyp připomínající T regulační buňky. U myšího modelu PE se tato indukční schopnost projevila jako nedostatečná (Nadkarni *et al.*, 2016).

#### **4.8. Subpopulace neutrofilů a jejich role v rozvoji preeklampsie**

Převaha prozánětlivých subpopulací neutrofilů na FMR by mohla způsobit poškození placenty. Bohužel na toto téma doposud nebyl proveden dostatečný výzkum. Nicméně prvotní studie poskytují náhled na významnou roli nedostatečné expanze subpopulace G-MDSC a obnovení jejich procentuálního zastoupení a funkce jako možného způsobu terapeutické intervence rozvoje PE.

##### **4.8.3. LDN**

LDN se podílí na navození imunitní tolerance na FMR (Ssemaganda *et al.*, 2014a), neboť exprimují Arg-1 (Kropf *et al.*, 2007) podobně jako G-MDSC. LDN byly nalezeny v CB, PB i placentě, na rozdíl od HDN, které nebylo možné z placenty izolovat (Ssemaganda *et al.*, 2014b). Možným prognostickým znakem rozvoje preeklampsie by mohl být poměr HDN/LDN s G-MDSC jako součástí LDN subpopulace.

##### **4.8.4. MDSC**

V průběhu normálního těhotenství se zvyšuje koncentrace G-MDSC na FMR (viz Obrázek 1), kde podporují vznik a udržení imunitní tolerance mimo jiné navozením regulačního fenotypu T lymfocytů včetně indukce exprese FoxP3 (Kang *et al.*, 2016). Wang *et al.* uskutečnili studii zaměřující se na porovnání hladin G-MDSC v PB a CB dětí žen s PE, zdravých těhotných žen a zdravých netěhotných žen (Wang *et al.*, 2018). Nejvýznamnějším pozorováním bylo výrazné zvýšení hladiny G-MDSC a Arg-1 v PB těhotných žen, které ale nebylo detekovatelné u žen s PE. Zde byly hladiny G-MDSC a Arg-1 srovnatelné s hladinami v PB zdravých netěhotných žen. Podobný trend byl naměřen i v CB, nedosáhl ale statistické significance. Autoři měřili také hladiny iNOS a NO v PB a CB, ale nepozorovali žádné rozdíly mezi ženami s PE a zdravými těhotnými ženami. Obě skupiny měly naopak snížené koncentrace iNOS a NO v porovnání se zdravými netěhotnými ženami. V návaznosti na pozorování navrhuje léčebný potenciál obnovení hladiny G-MDSC u pacientek s PE (Wang *et al.*, 2018).

## 5. Diskuze a závěr

Současné možnosti výzkumu poukazují na nepřehlédnutelný vliv neutrofilů na rozvoj a závažnost PE. Podstatná část dat ale pochází ze studií provedených na myším nebo potkáním modelu, proto se nedá jednoznačně předpovědět, zda budou mechanismy vlivu neutrofilů na indukci a progresi PE u lidí shodné s mechanismy pozorovanými u experimentálních zvířecích modelů. V tomto ohledu je tedy zapotřebí další důkladné studium provázanosti neutrofilů a PE u lidí. Za zmínku také stojí omezené možnosti výzkumu lidského FMR, kde by změny v PMN byly pravděpodobně nejlépe prokazatelné. Většinou se proto pracuje se vzorky periferní krve, kde jsou odchylky již méně patrné. Tím spíše je nutné používat kombinace několika prediktivních znaků. Potenciální prognostické znaky a způsoby léčby byly popsány, nedostatek komplexních informací ale brzdí případné klinické studie.

Tato bakalářská práce poskytuje alespoň částečné poodkrytí opony zahalující záhadné patologické procesy panující v nehostinném prostředí zánětlivé placenty, které mohou vyústit v komplikace ohrožující život jak matky tak plodu. Danému tématu bych se ráda dále věnovala během svého magisterského studia v laboratoři imunologie na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN v Praze. Diplomová práce bude zaměřena na určení proporčního zastoupení jednotlivých subpopulací neutrofilů a jejich funkčních vlastností v periferní a pupečnickové krvi žen s preeklampsií.

## Citovaná literatura

- Abi Abdallah, D. S., Egan, C., Butcher, B. A., Denkers, E. Y. (2011)** 'Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation', *International Immunology*, 23(5), 317–326. doi: 10.1093/intimm/dxr007.
- Ajah, L. O., Ozonu, N. C., Ezeonu, P. O., Lawani, L. O., Obuna, J. A., Onwe, E. O. (2016)** 'The Feto-Maternal Outcome of Preeclampsia with Severe Features and Eclampsia in Abakaliki, South-East Nigeria', *Journal of clinical and diagnostic research*, 10(9), QC18-QC21. doi: 10.7860/JCDR/2016/21078.8499.
- Aly, A. S., Khandelwal, M., Zhao, J., Mehmet, A. H., Sammel, M. D., Parry, S. (2004)** 'Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(1), 252–258. doi: 10.1016/j.ajog.2003.07.003.
- Artunc-Ulkumen, B., Guvenc, Y., Goker, A., Gozukara, C. (2015)** 'Relationship of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and procalcitonin levels with the presence and severity of the preeclampsia', *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 28(16), 1895–1900. doi: 10.3109/14767058.2014.972926.
- Azzouz, D., Khan, M., Swezey, N., Palaniyar, N. (2018)** 'Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis.', *Cell death discovery*, 4, 51. doi: 10.1038/s41420-018-0048-3.
- Björnsdóttir, H., Welin, A., Michaëlsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., Sundqvist, M., Dahlgren, C., Karlsson, A., Bylund, J. (2015)** 'Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species', *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1024–1035. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398.
- Bowen, R. S., Moodley, J., Dutton, M. F., Fickl, H. (2001)** 'Systemic inflammatory indices in pre-eclampsia and eclampsia', *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 21(6), 563–569. doi: 10.1080/01443610120085483.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., Papayannopoulos, V. (2014)** 'Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens.', *Nature immunology*, 15(11), 1017–25. doi: 10.1038/ni.2987.
- Brill, A., Fuchs, T., Savchenko, A. S., Thomas, G. M., Martinod, K., de Meyer, S. F., Bhandari, A. A., Wagner, D. D. (2012)** 'Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(1), 136–144. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004)** 'Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria', *Science*, 303(5663), 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385.
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007)** 'Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs', *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 577–582. doi: 10.1038/nrmicro1710.
- Brosens, I. (1964)** 'A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 71(2), 222–230. doi: 10.1111/j.1471-0528.1964.tb04270.x.
- Brown, M. A., Hague, W. M., Higgins, J., Lowe, S., McCowan, L., Oats, J., Peek, M. J., Rowan, J. A., Walters, B. N. J. (2000)** 'The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary', *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(2), 133–138. doi: 10.1111/j.1479-828X.2000.tb01136.x.

- Buchanan, J. T., Simpson, A. J., Azziz, R. K., Liu, G. Y., Kristian, S. A., Kotb, M., Feramisco, J., Nizet, V. (2006)** 'DNase Expression Allows the Pathogen Group A Streptococcus to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps', *Current Biology*, 16(4), 396–400. doi: 10.1016/J.CUB.2005.12.039.
- Canzoneri, B. J., Lewis, D. F., Groome, L., Wang, Y. (2009)** 'Increased neutrophil numbers account for leukocytosis in women with preeclampsia.', *American journal of perinatology*, 26(10), 729–32. doi: 10.1055/s-0029-1223285.
- Chen, J., Ye, Y., Liu, P., Yu, W., Wei, F., Li, H., Yu, J. (2017)** 'Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer', *Human Immunology*, 78(2), 113–119. doi: 10.1016/J.HUMIMM.2016.12.001.
- Chen, K.-H., Seow, K.-M. and Chen, L.-R. (2017)** 'Progression of gestational hypertension to pre-eclampsia: A cohort study of 20,103 pregnancies', *Pregnancy Hypertension*, 10, 230–237. doi: 10.1016/j.preghy.2017.10.001.
- Cordero-Franco, H. F., Salinas-Martínez, A. M., García-Alvarez, T. A., Maldonado-Sánchez, E. V., Guzmán-de la Garza, F. J., Mathiew-Quirós, A. (2018)** 'Discriminatory Accuracy of Preeclampsia Risk Factors in Primary Care', *Archives of Medical Research*, 49(4), 240–247. doi: 10.1016/j.arcmed.2018.09.006.
- Cotechini, T., Komisarenko, M., Sperou, A., Macdonald-Goodfellow, S., Adams, M. A., Graham, Ch. H. (2014)** 'Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia.', *The Journal of experimental medicine*, 211(1), 165–79. doi: 10.1084/jem.20130295.
- Crocker, I. P., Wellings, R. P., Fletcher, J., Baker, P. N. (1999)** 'Neutrophil function in women with pre-eclampsia.', *British journal of obstetrics and gynaecology*, 106(8), 822–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453833>.
- D'Souza, V., Rani, A., Patil, V., Pisal, H., Randhir, K., Mehendale, S., Wagh, G., Gupte, S., Joshi, S. (2016)** 'Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia', *Clinical and Experimental Hypertension*, 38(2), 225–232. doi: 10.3109/10641963.2015.1081226.
- von Dadelszen, P., Watson, R. W., Noorwali, F., Marschall, J. C., Parodo, J., Farine, D., Lye, S. J., Ritchie, J. W., Rotstein, O. D. (1999)** 'Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction.', *American journal of obstetrics and gynecology*, 181(2), 408–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454692>.
- Deshmukh, H. S., Liu, Y., Menkiti, O. R., Mei, J., Dai, N., O'Leary, C. E., Oliver, P. M., Kolls, J. K., Weiser, J. N., Worthen, G. S. (2014)** 'The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice.', *Nature medicine*, 20(5), 524–30. doi: 10.1038/nm.3542.
- Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J., Uhrova, H. (2004)** 'Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: Correlation with morphologic assessments', *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 18(1), 36–41. doi: 10.1002/jcla.20001.
- Erez, O., Romero, R., Maymon, E., Chaemsaitong, P., Done, B., Pacora, P., Panaitescu, B., Chaiworapongsa, T., Hassan, S. S., Tarca, A. L. (2017)** 'The prediction of late-onset preeclampsia: Results from a longitudinal proteomics study.', *PloS one*, 12(7), e0181468. doi: 10.1371/journal.pone.0181468.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007)** 'Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.', *The Journal of cell biology*, 176(2), 231–41. doi: 10.1083/jcb.200606027.

- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Meyers, D. D., Wroblewski, S., Wakefield, T. W., Hartwig, J. H., Wagner, D. D. (2010) 'Extracellular DNA traps promote thrombosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), 15880–15885. doi: 10.1073/pnas.1005743107.
- Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A. (2013) 'Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways.', *International immunopharmacology*, 17(3), 638–50. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.
- Gandley, R. E., Rohland, J., Zhou, Y., Shibata, E., Harger, G. F., Rajakumar, A., Kagan, V. E., Markovic, N., Hubel, C. A. (2008) 'Increased Myeloperoxidase in the Placenta and Circulation of Women With Preeclampsia', *Hypertension*, 52(2), 387–393. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107532.
- Gelber, S. E., Brent, E., Redecha, P., Perino, G., Tomlinson, S., Davidsson, R. L., Salmon, J. E. (2015) 'Prevention of Defective Placentation and Pregnancy Loss by Blocking Innate Immune Pathways in a Syngeneic Model of Placental Insufficiency.', *Journal of immunology*, 195(3), 1129–38. doi: 10.4049/jimmunol.1402220.
- Greer, I. A., Dawes, J., Johnston, T. A., Calder, A. A. (1991) 'Neutrophil activation is confined to the maternal circulation in pregnancy-induced hypertension.', *Obstetrics and gynecology*, 78(1), 28–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2047063>.
- Gu, Y., Lewis, D. F., Wang, Y. (2008) 'Placental Productions and Expressions of Soluble Endoglin, Soluble fms-Like Tyrosine Kinase Receptor-1, and Placental Growth Factor in Normal and Preeclamptic Pregnancies', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(1), 260–266. doi: 10.1210/jc.2007-1550.
- Gupta, A. K., Hasler, P., Holzgreve, W., Gebhardt, S., Hahn, S. (2005) 'Induction of Neutrophil Extracellular DNA Lattices by Placental Microparticles and IL-8 and Their Presence in Preeclampsia', *Human Immunology*, 66(11), 1146–1154. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.003.
- Gupta, A. K., Joshi, M. B., Philippova, M., Erne, P., Hahn, S., Resink, T. J. (2010) 'Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death', *FEBS Letters*, 584(14), 3193–3197. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.006.
- Henao, D. E., Cadavid, Á. P. and Saleem, M. A. (2013) 'Exogenous vascular endothelial growth factor supplementation can restore the podocyte barrier-forming capacity disrupted by sera of preeclamptic women', *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 39(1), 46–52. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01889.x.
- Hernández-Díaz, S., Toh, S., Cnattingius, S. (2009) 'Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 338, b2255. doi: 10.1136/bmj.b2255.
- Holthe, M. R., Staff, A. C., Berge, L. N., Fagerhol, M. K., Lyberg, T. (2005) 'Calprotectin plasma level is elevated in preeclampsia', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 84(2), 151–154. doi: 10.1111/j.0001-6349.2005.00554.x.
- Jääskeläinen, T., Heinonen, S., Hämäläinen, E., Pulkki, K., Romppanen, J., Laivuori, H. (2018) 'Impact of obesity on angiogenic and inflammatory markers in the Finnish Genetics of Preeclampsia Consortium (FINNPEC) cohort', *International Journal of Obesity*. doi: 10.1038/s41366-018-0217-8.
- Janani, F., Changae, F. (2017) 'Seasonal variation in the prevalence of preeclampsia.', *Journal of family medicine and primary care*, 6(4), 766–769. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc\_132\_17.
- Kang, X., Zhang, X., Liu, Z., Xu, H., Wang, T., He, L., Zhao, A. (2016) 'Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells by activation of the TGF-β/β-catenin pathway', *Molecular Human Reproduction*, 22(7), 499–511. doi: 10.1093/molehr/gaw026.

**Kaukoranta-Tolvanen, S.-S. E., Ronni, T., Leinonen, M., Saikku, P., Laitinen, K. (1996)** 'Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*', *Microbial Pathogenesis*, 21(5), 407–411. doi: 10.1006/mpat.1996.0071.

**Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R. M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D. A., Pennarthur, S., Kaplan, M. J. (2013)** 'NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis', *Science Translational Medicine*, 5(178), 178ra40-178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.

**Kim, H. K., De La Luz Sierra, M., Williams, C. K., Gulino, A. V., Tosato, G. (2006)** 'G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells.', *Blood*, 108(3), 812–20. doi: 10.1182/blood-2005-10-4162.

**Kim, S. M., Park, J. S., Norwitz, E. R., Jung, H. J., Kim, B. J., Park, C.-W., Jun, J. K. (2013)** 'Circulating Levels of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Correlate With the Presence and Severity of Preeclampsia', *Reproductive Sciences*, 20(9), 1083–1089. doi:10.1177/1933719113477480.

**de Kleijn, S., Langereis, J. D., Leentjens, J., Kox, M., Netea, M. G., Koenderman, L., Ferwerda, G., Pickkers, P., Hermans, P. W. M. (2013)** 'IFN- $\gamma$ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1.', *PloS one*, 8(8), e72249. doi: 10.1371/journal.pone.0072249.

**Köstlin, N., Kugel, H., Spring, B., Leiber, A., Marmé, A., Henes, M., Rieber, N., Hartl, D., Poets, C. F., Gille, C. (2014)** 'Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses', *European Journal of Immunology*, Ltd, 44(9), 2582–2591. doi: 10.1002/eji.201344200.

**Köstlin, N., Hofstädter, K., Ostermeir, A.-L., Spring, B., Leiber, A., Haen, S., Abele, H., Bauer, P., Pollheimer, J., Hartl, D., Poets, C. F., Gille, C. (2016)** 'Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype', *The Journal of Immunology*, 196(3), 1132–1145. doi: 10.4049/jimmunol.1500340.

**Köstlin, N., Vogelmann, M., Spring, B., Schwarz, J., Feucht, J., Härtel, C., Orlikowsky, T. W., Poets, C. F., Gille, C. (2017)** 'Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype', *Immunology*, 152(1), 89–101. doi: 10.1111/imm.12751.

**Kropf, P., Baud, D., Marshall, S. E., Munder, M., Mosley, A., Fuentes, J. M., Bangham, C. R. M., Taylor, G. P., Herath, S., Choi, B.-S., Soler, G., Teoh, T., Modolell, M., Müller, I. (2007)** 'Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy', *European Journal of Immunology*, 37(4), 935–945. doi: 10.1002/eji.200636542.

**Lakschevitz, F. S., Visser, M. B., Sun, C., Glogauer, M. (2015)** 'Neutrophil transcriptional profile changes during transit from bone marrow to sites of inflammation.', *Cellular & molecular immunology*, 12(1), 53–65. doi: 10.1038/cmi.2014.37.

**\*Lambert, G., Brichant, J. F., Hartstein, G., Bonhomme, V., Dewandre, P. Y. (2014)** 'Preeclampsia: an update.', *Acta anaesthesiologica Belgica*, 65(4), 137–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25622379>.

**Lampé, R., Scúcs, S., Ádány, R., Póka, R. (2011a)** 'Granulocyte superoxide anion production and regulation by plasma factors in normal and preeclamptic pregnancy', *Journal of Reproductive Immunology*, 89(2), 199–206. doi: 10.1016/J.JRI.2011.01.019.

**Lampé, R., Scúcs, S., Ádány, R., Póka, R. (2011b)** 'Granulocyte superoxide anion production and regulation by plasma factors in normal and preeclamptic pregnancy', *Journal of Reproductive Immunology*, 89(2), 199–206. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.019.

**Leik, C. E., Walsh, S. W. (2004)** 'Neutrophils Infiltrate Resistance-Sized Vessels of Subcutaneous Fat in Women With Preeclampsia', *Hypertension*, 44(1), 72–77. doi: 10.1161/01.HYP.0000130483.83154.37.

Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A. (2004) 'Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia', *New England Journal of Medicine*, 350(7), 672–683. doi: 10.1056/NEJMoa031884.

Li, Y., Li, H., Wang, H., Pan, H., Zhao, H., Jin, H., Jie, S. (2019) 'The proportion, origin and pro-inflammation roles of low density neutrophils in SFTS disease', *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 109. doi: 10.1186/s12879-019-3701-4.

Lim, K. H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S. H., Fisher, S. J. (1997) 'Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia.', *The American journal of pathology*, 151(6), 1809–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403732>.

Liu, Y., Hu, Y., Gu, F., Liang, J., Zeng, Y., Hong, X., Zhang, K., Liu, L. (2017) 'Phenotypic and clinical characterization of low density neutrophils in patients with advanced lung adenocarcinoma', *Oncotarget*, 8(53), 90969–90978. doi: 10.18632/oncotarget.18771.

Lokki, A. I., Kaartokallio, T., Holmberg, V., Onkamo, P., Koskinen, L. L. E., Saavalainen, P., Heinonen, S., Kajantie, E., Kere, J., Kivinen, K., Pouta, A., Villa, P. M., Hiltunen, L., Laivuori, H., Meri, S. (2017) 'Analysis of Complement C3 Gene Reveals Susceptibility to Severe Preeclampsia', *Frontiers in Immunology*, 8, 589. doi: 10.3389/fimmu.2017.00589.

Lu, C., Redd, P. S., Lee, J. R., Savage, N., Liu, K. (2016) 'The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells', *OncoImmunology*, 5(12), e1247135. doi: 10.1080/2162402X.2016.1247135.

Lynch, A. M., Gibbs, R. S., Murphy, J. R., Giclas, P. C., Salmon, J. E., Holers, V. M. (2011) 'Early elevations of the complement activation fragment C3a and adverse pregnancy outcomes.', *Obstetrics and gynecology*, 117(1), 75–83. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181fc3afa.

Lynch, A. M., Eckel, R. H., Murphy, J. R., Gibbs, R. S., West, N. A., Giclas, P. C., Salmon, J. E., Holers, V. M. (2012) 'Prepregnancy obesity and complement system activation in early pregnancy and the subsequent development of preeclampsia', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(5), 428.e1-428.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2012.02.035.

Magnus, P., Eskild, A. (2001) 'Seasonal variation in the occurrence of pre-eclampsia.', *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 108(11), 1116–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762648>.

Mannaerts, D., Faes, E., Cos, P., Briedé, J. J., Gyselaers, W., Cornette, J., Gorbanev, Y., Bogaerts, A., Spaanderman, M., van Craenenbroeck, E., Jacquemyn, Y. (2018) 'Oxidative stress in healthy pregnancy and preeclampsia is linked to chronic inflammation, iron status and vascular function.', *PloS one*, 13(9), e0202919. doi: 10.1371/journal.pone.0202919.

Marder, W., Knight, J. S., Kaplan, M. J., Somers, E. C., Zhang, X., O'Dell, A. A., Padmanabhan, V., Lieberman, R. W. (2016) 'Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies.', *Lupus science & medicine*, 3(1), e000134. doi: 10.1136/lupus-2015-000134.

Massena, S., Christoffersson, G., Vågesjö, E., Seignez, C., Gustafsson, K., Binet, F., Herrera Hidalgo, C., Giraud, A., Lomei, J., Westström, S., Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., Gerwins, P., Welsh, M., Kreuger, J., Phillipson, M. (2015) 'Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans.', *Blood*, 126(17), 2016–26. doi: 10.1182/blood-2015-03-631572.

Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Apella, E., Kung, H. F., Leonard, E. J., Oppenheim, J. J. (1988) 'Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor.', *The Journal of experimental medicine*, 167(6), 1883–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3260265>.

- Maynard, S. E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A. (2003)** 'Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia.', *The Journal of clinical investigation*, 111(5), 649–58. doi: 10.1172/JCI17189.
- Meggyes, M., Miko, E., Lajko, A., Csiszar, B., Sandor, B., Matrai, P., Tamas, P., Szereday, L. (2019)** 'Involvement of the PD-1/PD-L1 Co-Inhibitory Pathway in the Pathogenesis of the Inflammatory Stage of Early-Onset Preeclampsia.', *International journal of molecular sciences*, 20(3), 583, doi: 10.3390/ijms20030583.
- Mentese, A., Guven, S., Demir, S., Sumer, A., Ozer Yaman, S., Alver, A., Sonmez, M., Karahan, S. (2018)** 'Circulating parameters of oxidative stress and hypoxia in normal pregnancy and HELLP syndrome', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(11), 1567–1572. doi: 10.17219/acem/74653.
- van der Merwe, J. L., Hall, D. R., Wright, C., Schubert, P., Grové, D. (2010)** 'Are Early and Late Preeclampsia Distinct Subclasses of the Disease—What Does the Placenta Reveal?', *Hypertension in Pregnancy*, 29(4), 457–467. doi: 10.3109/10641950903572282.
- Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V. (2011)** 'Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity', *Blood*, 117(3), 953–959. doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.
- Miyoshi, A., Yamada, M., Shida, H., Nakazawa, D., Kusunoki, Y., Nakamura, A., Miyoshi, H., Tomaru, U., Atsumi, T., Ishizu, A. (2016)** 'Circulating Neutrophil Extracellular Trap Levels in Well-Controlled Type 2 Diabetes and Pathway Involved in Their Formation Induced by High-Dose Glucose', *Pathobiology*, 83(5), 243–251. doi: 10.1159/000444881.
- Morita, S., Nakamaru, Y., Nakazawa, D., Suzuki, M., Hoshino, K., Fukuda, A., Hattanda, F., Kusunoki, K., Tomaru, U., Ishizu, A., Homma, A. (2018)** 'The Diagnostic and Clinical Utility of the Myeloperoxidase-DNA Complex as a Biomarker in Otitis Media With Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Vasculitis.', *Otology & Neurotology*, 40(2), e99-e106, doi: 10.1097/MAO.0000000000002081.
- Munn, D. H., Schafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A. L. (1999)** 'Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.', *The Journal of experimental medicine*, 189(9), 1363–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224276>.
- Nadkarni, S., Smith, J., Sferruzzi-Perri, A. N., Ledwozyw, A., Kishore, M., Haas, R., Mauro, C., Williams, D. J., Farsky, S. H. P., Marelli-Berg, F. M., Perretti, M. (2016)** 'Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(52), E8415–E8424. doi: 10.1073/pnas.1611944114.
- Ngwenya, S. (2017)** 'Severe preeclampsia and eclampsia: incidence, complications, and perinatal outcomes at a low-resource setting, Mpilo Central Hospital, Bulawayo, Zimbabwe', *International Journal of Women's Health*, 9, 353–357. doi: 10.2147/IJWH.S131934.
- Noyan, T., Güler A., Sekeroglu, M. R., Kamaci, M. (2006)** 'Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia', *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46(6), 486–491. doi: 10.1111/j.1479-828X.2006.00647.x.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Figley, C., Long, R., Park, D., Carter, D., Clements, V. K. (2017)** 'Frontline Science: Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) facilitate maternal–fetal tolerance in mice', *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5), 1091–1101. doi: 10.1189/jlb.1HI1016-306RR.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., Zychlinsky, A. (2010)** 'Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps', *The Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. doi: 10.1083/jcb.201006052.



- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K., Koenderman, L. (2010) 'In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days', *Blood*, 116(4), 625–627. doi: 10.1182/blood-2010-01-259028.
- Prieto, J. A., Panyutich, A. V., Heine, R. P. (1997) 'Neutrophil activation in preeclampsia. Are defensins and lactoferrin elevated in preeclamptic patients?', *The Journal of reproductive medicine*, 42(1), 29–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018642>.
- Rafaeli-Yehudai, T., Imterat, M., Douvdevani, A., Tirosh, D., Benshalom-Tirosh, N., Mastrolia, S. A., Beer-Weisel, R., Klaitman, V., Riff, R., Greenbaum, S., Alioshin, A., Rodavsky Hanegbi, G., Loverro, G., Catalano, M. R., Erez, O. (2018) 'Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation.', *PloS one*, 13(7), e0200360. doi: 10.1371/journal.pone.0200360.
- Ramma, W., Buhimschi, I. A., Zhao, G., Dulay, A. T., Nayeri, U. A., Buhimschi, C. S., Ahmed, A. (2012) 'The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia.', *Angiogenesis*, 15(3), 333–40. doi: 10.1007/s10456-012-9261-5.
- Regal, J. F., Lillegard, K. E., Bauer, A. J., Elmquist, B. J., Loeks-Johnson, A. C., Gilbert, J. S. (2015) 'Neutrophil Depletion Attenuates Placental Ischemia-Induced Hypertension in the Rat.', *PloS one*, 10(7), e0132063. doi: 10.1371/journal.pone.0132063.
- Rieber, N., Gille, C., Köstlin, N., Schäfer, I., Spring, B., Ost, M., Spieles, H., Kugel, H. A., Pfeiffer, M., Heininger, V., Alkhaled, M., Hector, A., Mays, L., Kormann, M., Zundel, S., Fuchs, J., Handgretinger, R., Poets, C. F., Hartl, D. (2013) 'Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses', *Clinical & Experimental Immunology*, 174(1), 45–52. doi: 10.1111/cei.12143.
- Rocha-Penha, L., Bettiol, H., Barbieri, M. A., Cardoso, V. C., Cavalli, R. C., Sandrim, V. C. (2017) 'Myeloperoxidase is not a good biomarker for preeclampsia prediction', *Scientific Reports*, 7(1), 10257. doi: 10.1038/s41598-017-09272-4.
- Rodriguez-Lopez, M., Wagner, P., Perez-Vicente, R., Crispi, F., Merlo, J. (2017) 'Revisiting the discriminatory accuracy of traditional risk factors in preeclampsia screening', *PLOS ONE*, 12(5), e0178528. doi: 10.1371/journal.pone.0178528.
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., Ochoa, A. C. (2002) 'Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine.', *The Journal of biological chemistry*, 277(24), 21123–9. doi: 10.1074/jbc.M110675200.
- Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., Ariel, A., Hovav, A.-H., Henke, E., Fridlender, Z. G., Granot, Z. (2015) 'Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer', *Cell Reports*, 10(4), 562–573. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.039.
- Sedeek, M., Gilbert, J. S., LaMarca, B. B., Sholook, M., Chandler, D. L., Wang, Y., Granger, J. P. (2008) 'Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats.', *American journal of hypertension*, 21(10), 1152–6. doi: 10.1038/ajh.2008.239.
- Segal, A. W., Dorling, J., Coade, S. (1980) 'Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies.', *The Journal of cell biology*, 85(1), 42–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7364874>.
- Shaarawy, M., Youssef el-Mallah, S., el-Yamani, A. M. (1997) 'The prevalence of serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in preeclampsia and eclampsia.', *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 4(1), 34–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051632>.

- Shorter, S. C., Vince, G. S., Starkey, P. M. (1992)** 'Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy.', *Immunology*, 75(3), 468–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374054>.
- Shukla, J., Walsh, S. W. (2015)** 'Neutrophil Release of Myeloperoxidase in Systemic Vasculature of Obese Women May Put Them at Risk for Preeclampsia', *Reproductive Sciences*, 22(3), 300–307. doi: 10.1177/1933719114557899.
- Sikkema, J. M., van Rijn, B. B., Franx, A., Bruinse, H. W., de Roos, R., Stroes, E. S. G., van Faassen, E. E. (2001)** 'Placental Superoxide is Increased in Pre-eclampsia', *Placenta*, 22(4), 304–308. doi: 10.1053/plac.2001.0629.
- Ssemaganda, A., Kindinger, L., Bergin, P., Nielsen, L., Mpendo, J., Ssetaala, A., Kiwanuka, N., Munder, M., Teoh, T. G., Kropf, P., Müller, I. (2014a)** 'Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies.', *PloS one*, 9(2), e85696. doi: 10.1371/journal.pone.0085696.
- Ssemaganda, A., Kindinger, L., Bergin, P., Nielsen, L., Mpendo, J., Ssetaala, A., Kiwanuka, N., Munder, M., Teoh, T. G., Kropf, P., Müller, I. (2014b)** 'Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies.', *PloS one*, 9(2), e85696. doi: 10.1371/journal.pone.0085696.
- Sun, L., Mao, D., Cai, Y., Tan, W., Hao, Y., Li, L., Liu, W. (2016)** 'Association between higher expression of interleukin-8 (IL-8) and haplotype -353A/-251A/+678T of IL-8 gene with preeclampsia: A case-control study.', *Medicine*, 95(52), e5537. doi: 10.1097/MD.0000000000005537.
- Sur Chowdhury, C., Hahn, S., Hasler, P., Hoesli, I., Lapaire, O., Giaglis, S. (2016)** 'Elevated Levels of Total Cell-Free DNA in Maternal Serum Samples Arise from the Generation of Neutrophil Extracellular Traps', *Fetal Diagnosis and Therapy*, 40(4), 263–267. doi: 10.1159/000444853.
- Tannetta, D. S., Dragovic, R. A., Gardiner, C., Redman, C. W., Sargent, I. L. (2013)** 'Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin.', *PloS one*, 8(2), e56754. doi: 10.1371/journal.pone.0056754.
- Tsukimori, K., Fukushima, K., Tsushima, A., Nakano, H. (2005)** 'Generation of Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Endothelial Cell Injury in Normal and Preeclamptic Pregnancies', *Hypertension*, 46(4), 696–700. doi: 10.1161/01.HYP.0000184197.11226.71.
- Tuffnell, D. J., Jankowicz, D., Lindow, S. W., Lyons, G., Mason, G. C., Russell, I. F., Walker, J. J. (2005)** 'Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(7), 875–880. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00565.x.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., Zychlinsky, A. (2009)** 'Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*.', *PLoS pathogens*, 5(10), e1000639. doi: 10.1371/journal.ppat.1000639.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., Karumanchi, S. A. (2006)** 'Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia', *Nature Medicine*, 12(6), 642–649. doi: 10.1038/nm1429.
- Wallis, A. B., Saftlas, A. F., Hsia, J., Atrash, H. K. (2008)** 'Secular Trends in the Rates of Preeclampsia, Eclampsia, and Gestational Hypertension, United States, 1987-2004', *American Journal of Hypertension*, 21(5), 521–526. doi: 10.1038/ajh.2008.20.
- Walshe, T. E., Dole, V. S., Maharaj, A. S. R., Patten, I. S., Wagner, D. D., D'Amore, P. A. (2009)** 'Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  Signaling Activates Endothelium and Increases Leukocyte Rolling', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(8), 1185–1192. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.186742.
- Wang, W., Peng, W., Ning, X. (2018)** 'Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis', *International Journal of Rheumatic Diseases*, 21(2), 415–421. doi: 10.1111/1756-185X.13226.

- Wang, Y., Gu, Y., Philibert, L., Lucas, M. J. (2001)** 'Neutrophil Activation Induced by Placental Factors in Normal and Pre-eclamptic Pregnancies In Vitro', *Placenta*, 22(6), 560–565. doi: 10.1053/plac.2001.0691.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correl, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., Coonrod, S. A. (2009)** 'Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation.', *The Journal of cell biology*, 184(2), 205–13. doi: 10.1083/jcb.200806072.
- Wang, Y., Liu, Y., Shu, C., Wan, J., Shan, Y., Zhi, X., Sun, L., Yi, H., Yang, Y.-G., He, J. (2018)** 'Inhibition of pregnancy-associated granulocytic myeloid-derived suppressor cell expansion and arginase-1 production in preeclampsia', *Journal of Reproductive Immunology*, 127, 48–54. doi: 10.1016/j.jri.2018.05.002.
- Waugh, D. J. J., Wilson, C. (2008)** 'The Interleukin-8 Pathway in Cancer', *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6735–6741. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.
- Yancey, L. M., Withers, E., Bakes, K., Abbott, J. (2011)** 'Postpartum Preeclampsia: Emergency Department Presentation and Management', *The Journal of Emergency Medicine*, 40(4), 380–384. doi: 10.1016/j.jemermed.2008.02.056.
- Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., Gabrilovich, D. I. (2008)** 'Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.', *Journal of immunology*, 181(8), 5791–802. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832739>.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H. U. (2009)** 'Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps', *Cell Death & Differentiation*, 16(11), 1438–1444. doi: 10.1038/cdd.2009.96.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E., Scheiermann, C., Merad, M., Frenette, P. S. (2015)** 'Neutrophil ageing is regulated by the microbiome.', *Nature*, 525(7570), 528–32. doi: 10.1038/nature15367.

\*označuje sekundární citaci